

Untersuchungen zur Antigenstruktur von *Candida pseudotropicalis*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christa-Maria Beck
aus Berlin-Schöneberg

Marburg 1968

Untersuchungen zur Antigenstruktur von *Candida pseudotropicalis*



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christa-Maria Beck
aus Berlin-Schöneberg

Marburg 1968



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 29.2.1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dekan: Professor Dr. med. R. Siegert

Referent: Professor Dr. med. R. Siegert

Correferent: Privatdozent Dr. med. W. Schiff

Inhaltsverzeichnis

=====

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Methodik</u>	3
I. Benutzte Stämme	3
II. Antigengewinnung	4
a) Züchtung der Hefen	4
b) Homogenisieren	4
c) Trennung von Zellwand und -Inhalt	4
III. Extraktionen	4
a) Ammoniumsulfatfällung	4
b) KOH-Extraktion	5
IV. Gewinnung von Antiseren	5
V. Agarelektrophorese	6
VI. Immunelektrophorese	7
C. <u>Ergebnisse</u>	8
I. Untersuchungen des Homogenisates von C. pseudotropicalis	8
a) Agarelektrophorese	8
b) Immunelektrophorese	10
II. Thermolabile Antigene bei C. pseudotropi- calis und deren Lokalisation	11
a) Agglutination	11
b) Immunelektrophorese	11
c) Immunelektrophorese nach Absorption von Immunseren	12

	<u>Seite</u>
III. Kreuzreaktionen	15
a) Homogenisat von <i>C. pseudotropicalis</i> gegen heterologe Antiseren	15
b) <i>C. pseudotropicalis</i> -Serum gegen Homogeni- sat von heterologen Sproßpilzen	15
IV. Antigenisolierungen an <i>C. pseudotropicalis</i>	17
a) KOH-Extraktion	19
b) Ammoniumsulfatfällung	20
V. Kreuzreaktionen mit fraktioniertem Antigen von <i>C. pseudotropicalis</i>	25
a) Ammoniumsulfatfraktionen gegen heterologe Seren	25
b) Seren der Ammoniumsulfatfraktionen gegen heterologe Sproßpilzhomogenisate	27
D. <u>Diskussion</u>	29
E. <u>Zusammenfassung</u>	34
F. <u>Literatur</u>	36

A. Einleitung

=====

Unter den für Menschen und verschiedenen Tierspezies obligat bzw. fakultativ pathogenen Pilzen haben die Arten der Candidagruppe in Europa die größte Bedeutung, und zwar sowohl als Ursache für Primär- als auch für Sekundärerkrankungen (HIATT und Mitarb. 1946, KLIGMANN und Mitarb. 1950, SALVIN und Mitarb. 1950, KLOSE und Mitarb. 1952, BROWN, WEINGART, CONN und Mitarb. 1959, SCHABINSKI 1960, POSPISIL 1960, HIGUCHI und Mitarb. 1961, POLEMANN 1961, SEELIGER 1962, SCHERREIN 1963, SKOBEL und Mitarb. 1955). Aus diesen Berichten geht hervor, daß nicht nur *C. albicans*, sondern auch weniger verbreitete Candidaarten fakultativ pathogen sein können.

Eine Differenzierung der Hefen ist deshalb unerlässlich. Die wichtigsten Gesichtspunkte bei der Diagnostik sind morphologische, biochemische und in letzter Zeit auch serologische Kriterien.

Von den oben aufgeführten Candidaarten sind *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. krusei* am ausführlichsten vor allem in Bezug auf ihre Antigenstruktur untersucht (MÜLLER und HIRSCH 1967, MÜLLER und DUPONT 1967, u.a.). Die Serologie der Pilze hat auf klinischem und wissenschaftlichem Gebiet in den letzten Jahren sowohl im Hinblick auf den Antikörpernachweis, als auch für die Klassifizierung der Sproßpilze erheblich an Bedeutung und Interesse gewonnen.

C. pseudotropicalis ist als fakultativ pathogene Hefeart bekannt, die als imperfekte Form des in Milch und Milchprodukten vorkommenden *S. fragilis* gilt. Morphologisch treten länglich-ovale Hefezellen von 3 - 5 μ Durchmesser (LODDER und KREGER-van RIJ 1952), daneben aber auch Pseudomyzelzellen auf.

Kulturell bildet *C. pseudotropicalis* flache, glänzende Kolonien von cremefarbenem Aussehen, die innerhalb von 24 - 48 Stunden bei einem Temperaturoptimum von 30°C auf den üblichen Pilznährböden - z.B. Sabouraud-Maltoseagar - entstehen. Jedoch ist das Wachstum wesentlich spärlicher als z.B. bei *C. albicans*.

Unter ihren biochemischen Eigenschaften sind die wichtigsten die Assimilation und Fermentation verschiedener Zucker: Glucose, Galactose, Saccharose und Lactose werden sowohl assimiliert als auch fermentiert, während Maltose von *C. pseudotropicalis* chemisch nicht angegriffen wird.

Zur Erweiterung der bisherigen Antigenuntersuchungen an *Candida*-arten soll in dieser Arbeit die Antigenstruktur von *C. pseudotropicalis* sowie ihre Verwandtschaft zu anderen Sprosspilzen untersucht werden.

B. Methodik

=====

I. Benutzte Stämme

<u>Species:</u>	<u>Herkunft:</u>
<i>Candida albicans</i> 256	CBS*
<i>Candida tropicalis</i> 94	CBS
<i>Candida pseudotropicalis</i>	CBS
<i>Candida utilis</i> 840	CBS
<i>Candida stellatoidea</i>	CBS
<i>Candida curvata</i>	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida krusei</i>	CBS
<i>Candida guilliermondii</i>	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida reukaufii</i> S 56-192	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida brumptii</i>	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida lipolytica</i>	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida parapsilosis</i>	Dermatologische Klinik Marburg
<i>Candida scottii</i> CBS 2300	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida macedoniensis</i> S 37-81	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Candida robusta</i>	CBS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS
<i>Saccharomyces rouxii</i>	CBS
<i>Torulopsis dattila</i>	Dermatologische Klinik Marburg
<i>Torulopsis glabrata</i> 5311	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Torulopsis famata</i> 935	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Torulopsis inconspicua</i> S 181-315	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	CBS
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hygiene-Institut Würzburg
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Dermatologische Klinik Marburg

* CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft.

II. Antigengewinnung

a) Züchtung der Hefen:

Die auf Sabouraud-Maltoseagar (Difco Spezialagar Noble) gezüchteten Hefestämme wuchsen nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C zu einem dichten, flachen Zellrasen, der mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und zentrifugiert wurde. Das Zentrifugat wurde dreimal mit NaCl-Lösung gewaschen und erneut in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

b) Homogenisieren:

In eine zur Hälfte mit Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) gefüllte Flasche kam eine ca. 50%ige Hefezellsuspension. Die Zellen wurden durch Schütteln (4 Min.) im Homogenisator der Fa. Braun, Melsungen, unter Kühlung mit CO₂-Schnee aufgeschlossen. Das entstandene Homogenisat diente als Vollantigen, d.h. es enthielt die antigenen Substanzen von Zellwänden und Zellinhalt. Wir verwendeten es zur Immunisierung von Kaninchen und in der Immunelektrophorese.

c) Trennung von Zellwand und -Inhalt:

Das Homogenisat wurde zentrifugiert, um die Zellwände vom Zellinhalt abzutrennen. Nach vorsichtigem Abheben des überstehenden Inhalts wurden die Zellwände in Aqua dest. aufgenommen.

III. Extraktionen

a) Ammoniumsulfatfällung:

Der Inhalt der Hefezellen ist zu 50 % mit Ammoniumsulfat abgesättigt und 4 Stunden bei 4°C aufbewahrt worden. Danach wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert, 2- bis 3-mal im Fällungsmittel nachgewaschen, in wenig physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und vor seiner Weiterverwendung gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert.

Ausgehend von dem ursprünglichen Volumen wurde der verbliebene Überstand mit acht Teilen gesättigtem Ammoniumsulfat versetzt. Nach etwa 16 Stunden lag ein weiterer Niederschlag vor, der nach derselben Methode weiterbehandelt wurde wie der Niederschlag nach 50%iger Absättigung. Der abgehobene Überstand wurde 2 - 3 Tage gegen Leitungswasser und anschließend noch etwa 48 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert. Das Volumen wurde im Rotationsverdampfer bei 30°C jeweils auf wenige ml eingeengt. Nach abgeschlossener Dialyse erfolgte die aerobe und anaerobe Prüfung der Sterilität der einzelnen Fraktionen. Waren sie unsteril, so setzten wir dem unlöslichen 50%igen Niederschlag Antibiotika in ausreichender Menge (z.B. 5 mg% Chloramphenicol) zu oder wir filtrierten den löslichen, 90%igen Niederschlag und den Überstand durch ein bakteriendichtes Filter. Alle Fraktionen fanden als Antigene in der Immunelektrophorese und bei der Immunisierung von Kaninchen Verwendung.

b) KOH-Extraktion:

Die Hefezellen wurden so oft in Aqua dest. nachgewaschen, bis sie mikroskopisch frei von anhaftenden Inhaltsstoffen waren. Nach dem Abzentrifugieren versetzten wir sie zu gleichen Teilen mit 1m KOH. Nach Rühren für 30 Min. bei Zimmertemperatur mit dem Magnetrührer und zweitägiger Dialyse gegen Aqua dest. erfolgte die Fällung mit der sechsfachen Menge Alkohol. Der entstandene Niederschlag wurde in Aqua dest. oder physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

IV. Gewinnung der Antiseren

Als Antigene zur Immunisierung von Kaninchen wurden von *C. pseudotropicalis* verwendet:

1. Vollantigen (Homogenisat)
2. Niederschlag nach 50%iger Ammoniumsulfatfällung
3. Niederschlag nach 90%iger Ammoniumsulfatfällung
4. Überstand nach 90%iger Ammoniumsulfatfällung

Die Kaninchen wurden nach folgendem Schema intravenös (Ohrvene) immunisiert:

1. Woche: Mit 0,5 ml Antigen beginnend erhielten die Tiere ansteigende Antigenmengen bis zur Maximalmenge von 2,0 ml;
2. und 3. Woche: jeden zweiten Tag 2,0 ml.

Die erste Blutentnahme erfolgte 5 Tage nach der letzten Injektion. Das gewonnene Blut wurde etwa 1 Stunde im Wärmeschrank aufbewahrt und anschließend 1 - 2 Stunden im Kühlschrank gehalten. Nach Zentrifugation erfolgte die Abtrennung des Serums.

Die Tiere wurden noch 2- bis 3-mal mit je 2,0 ml Antigen nachimmunisiert. Zwischen den einzelnen Injektionen nahmen wir Probepunktionen zur Prüfung der Antikörperbildung vor. Die Immunisierungen wurden abgebrochen, sobald keine weiteren Präzipitationslinien mehr auftraten.

V. Agarelektrophorese

Zur Antigenauftrennung im elektrischen Feld diente die Agarelektrophorese nach GRABAR und WILLIAM, modifiziert nach SCHEIDEGGER (1955). Wir benutzten einen Diäthylbarbitursäurepuffer nach MICHAELIS (1951) folgender Zusammensetzung:

6,48 g Natriumazetat

9,81 g Natriumbarbital

Beide Substanzen wurden in 1.000 ml H₂O gelöst und mit einer 1n Salzsäure auf einen pH-Wert von 8,2 eingestellt. 1,2%iger Difco Spezialagar Noble wurde mit 50 ml Aqua dest. und derselben Menge Puffer 15 Min. bei 100°C im Wasserbad gekocht und mit einer Pipette auf vorbereitete Objektträger gegossen. Nach dem Erstarren wurde mit einem Filterpapierstreifen ein etwa 5 mm langer Graben senkrecht zur Wanderungsrichtung ausgehoben und mit den jeweiligen Antigenen gefüllt. In den Elektrodengefäßen befand sich dieselbe Pufferlösung wie oben. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 1 Stunde bei einer Spannung von 250 V. Nach Fixation der Präparate in Methanol-Eisessig-Wasser (Verhältnis 9 : 1 : 5) bzw. in Alkohol-Wasser (Verhältnis 9 : 1) für 5 - 10 Stunden und anschließender

Lufttrocknung erfolgte die Färbung. Die in Methanol-Eisessig-Wasser fixierten Präparate wurden mit 0,5%igem Amidoschwarz der Fa. Merck gefärbt. Bei den in Alkohol-Wasser fixierten Präparaten erfolgte die Färbung mit einer 1%igen Perjodsäurelösung und 1%igem SCHIFF'schem Reagens (PAS).

VI. Immunelektrophorese

Puffer und Herstellung der Agarplatten entsprachen der Agarelektrophorese. Nach Einbringen je eines Tropfens der Antigenlösung in die Stanzlöcher und einstündiger Elektrophorese bei 250 V erfolgte das Auftragen des Immunserums. Die Entwicklung der Präzipitationslinien war nach 48 Stunden abgeschlossen. Darauf folgte eine Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, um das nicht gebundene Antigen und Antiserum zu entfernen. Nach 12 Stunden trockneten wir die Agarschicht unter Fließpapierstreifen über Nacht und färbten, nach Entfernung der Papierreste mit Leitungswasser, 1 Stunde mit Amidoschwarz. Die erste Nachdifferenzierung erfolgte in Methanol-Eisessig, die zweite in Aqua dest.

C. Ergebnisse

=====

I. Untersuchungen des Homogenisates von C. pseudotropicalis

a) Agarelektrophorese:

Nach Untersuchungen von MÜLLER und HIRSCH (1967) trennen sich das Homogenisat bzw. der Zellinhalt von C. albicans und C. tropicalis in kathodenwärts wandernde Polysaccharide, die sich mit PAS bzw. nach BEST anfärben ließen, und zur Anode wandernde Eiweißsubstanzen auf, die durch Amidoschwarz, Azokarmin oder Lichtgrün markierbar waren. Wir untersuchten deshalb zunächst, ob auch in dem Homogenisat von C. pseudotropicalis unterschiedliche Substanzgruppen vorhanden sind.

Wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, wandert ein Teil des Homogenisates zur Anode, ein anderer zur Kathode. Auf der Kathodenseite stellt sich nach PAS-Färbung eine durchlaufende Bande von unterschiedlicher Farbintensität dar. Es handelt sich also um mehrere, in dieser Bande enthaltene Fraktionen. Auch mit Amidoschwarz färbt sich ein Teil der kathodenwärts wandernden Substanzen an, jedoch in geringerer Intensität und ohne Ansatz zur Fraktionierung.

Auf der Anodenseite zeigt sich ein umgekehrtes Verhalten. Hier ist die Anfärbung mit Amidoschwarz am deutlichsten ausgeprägt, während durch PAS nur Spuren nachweisbar sind.

Nach Erhitzen des Homogenisates auf 60°C bzw. 100°C lassen sich auf der Anodenseite weder mit PAS noch mit Amidoschwarz Substanzen darstellen, wohl ein Zeichen dafür, daß diese durch das Erhitzen denaturiert worden sind.

Die zur Kathode wandernden Stoffe dagegen bleiben bei beiden Temperaturen erhalten, lassen sich aber nur noch mit PAS anfärben (s. Abbildungen 3 und 4).



Abb. 1: Homogenisat *C. pseudotropicalis* (Amidoschwarz)



Abb. 2: Homogenisat *C. pseudotropicalis* (PAS)



Abb. 3: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nach Erhitzen auf 60°C (PAS)

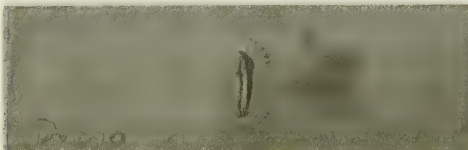


Abb. 4: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nach Erhitzen auf 100°C (PAS)

b) Immunelektrophorese:

Die in der Agarelektrophorese nachgewiesenen beiden Substanzgruppen wurden in der Immunelektrophorese auf ihre serologische Aktivität geprüft. Dazu wurde das Homogenisat nach elektrophoretischer Auftrennung mit dem durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Antiserum zusammengebracht. Nach genügend langer Einwirkung des Serums bildeten sich auf Kathoden-, Anodenseite und am Auftragspunkt Präzipitationslinien aus. Am Auftragspunkt handelt es sich wohl um Anteile beider Substanzgruppen, die unter den gegebenen Bedingungen nicht im elektrischen Feld wandern.

Wie die Abbildung 5 zeigt, ergab das Homogenisat in der Immunelektrophorese folgendes Bild: mindestens drei bis vier Linien auf der Anodenseite, ein bis zwei Linien am Auftragspunkt, drei bis vier Linien auf der Kathodenseite. Die Linien der Anodenseite sind gut gegeneinander abgegrenzt, gleichmäßig stark im Verlauf, kurz und zart, so daß man nach Untersuchungen von GRABAR an Humanserum (1955) wohl annehmen darf, daß es sich um Einzelantigene handelt. Die Präzipitate auf der Kathodenseite und am Auftragspunkt haben jeweils ein Maximum am Scheitelpunkt der Linien und sind an den Bogenenden fein ausgezogen. Die einzelnen Linien sind untereinander in ihrem Verlauf nicht so exakt wie die anodenwärts gelegenen voneinander zu trennen.

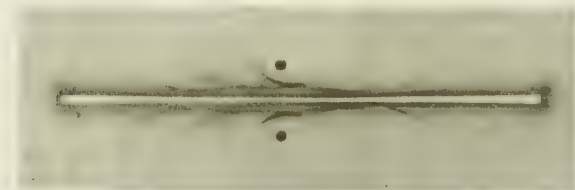


Abb. 5: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis*
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis*
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*

II. Thermolabile Antigene bei C. pseudotropicalis und deren Lokalisation

Nach den Mitteilungen verschiedener Autoren (KEMP und SOLOTOROWSKY 1964, TSUCHIYA 1955, POSPISIL 1959) soll C. pseudotropicalis neben thermostabilen auch thermolabile Antigene besitzen. Zum Nachweis solcher thermolabilen Antigene verwendeten wir drei Methoden: die Zellagglutination im Röhrchen, die Immunelektrophorese sowie die Kombination von Zellabsorption und Immunelektrophorese.

a) Agglutination:

Serum, das durch Immunisierung von Kaninchen mit nicht erhitztem Zellhomogenisat von C. pseudotropicalis gewonnen worden war, wurde einmal mit einer Aufschwemmung nicht erhitzter, zum anderen mit eine Stunde auf 60°C erhitzten Zellen in Röhrchen zur Reaktion gebracht. Zu 0,5 ml Serumverdünnung (Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2, beginnend bei 1 : 5) kamen 0,5 ml Zellsuspension. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und Aufbewahrung über Nacht im Kühlschrank erfolgte die Beurteilung mit einem Agglutinoskop. Mit den nicht erhitzten Zellen konnte ein Serumtiter von 1 : 160 erfaßt werden, mit den auf 60°C erhitzten Zellen dagegen nur ein Titer von 1 : 40. Die gleiche Versuchsanordnung wurde mit den Zellwänden von C. pseudotropicalis wiederholt. Hierbei zeigte sich jedoch in Kontrollröhrchen Spontanagglutination, so daß die Ergebnisse nicht verwertbar waren.

b) Immunelektrophorese:

Die Gegenüberstellung nicht erhitzten und erhitzten Homogenisates von C. pseudotropicalis in der Immunelektrophorese mit einem gegen nicht erhitztes Homogenisat gewonnenen Immunserum ergab, wie die Abbildungen 6 und 7 erkennen lassen, einen Verlust an Präzipitaten bei Verwendung von erhitztem Homogenisat. Auf der Kathodenseite läßt sich sowohl mit auf 60°C als auch

mit auf 100°C erhitztem Homogenisat eine Linie weniger als mit nicht erhitztem Homogenisat darstellen. Auf der Anodenseite sind mit dem auf 100°C erhitzten Antigen keine Präzipitationslinien, mit dem auf 60°C erhitzten nur ein Teil der mit unerhitztem Homogenisat auftretenden Linien nachweisbar.

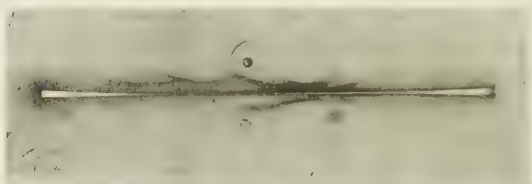


Abb. 6: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nicht erhitzt
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis* auf 60°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*

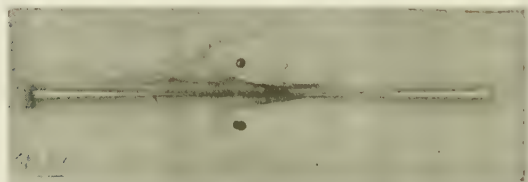


Abb. 7: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nicht erhitzt
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis* auf 100°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*

c) Immunelektrophorese nach Absorption von Immunseren:

Immunserum, wie unter a) und b) bereits aufgeführt, wurde sowohl mit nicht erhitzten (Kontrolle) als auch mit erhitzten *C. pseudotropicalis*-Zellen absorbiert. Ein Teil Serum wurde mit zwei Teilen Zellsediment versetzt, eine Stunde bei 37°C im Wasserbad und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C belassen, zentrifugiert und das überstehende, nun absorbierte Serum vorsichtig abgehoben.

Beide mit unerhitzten bzw. auf 60°C erhitzten Zellen absorbierten Seren wurden in der Immunelektrophorese gegen unerhitztes, auf 60°C erhitztes und auf 100°C erhitztes Zellhomogenisat geprüft.

Wie aus den Abbildungen 8 und 9 ersichtlich ist, bildet das mit nicht erhitzten Zellen absorbierte Serum auf der Kathodenseite weder mit dem unerhitzten noch mit dem erhitzten Homogenisat Präzipitationslinien. Dagegen lassen sich auf der Anodenseite mit dem gleichen Homogenisat die gleiche Anzahl von Linien nachweisen wie vor der Absorption.

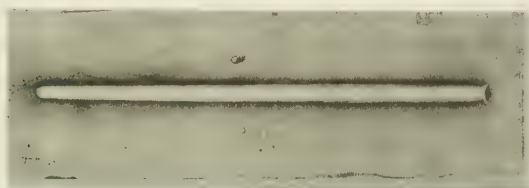


Abb. 8: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nicht erhitzt
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis* auf 60°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*,
absorbiert mit nicht erhitzten Zellen

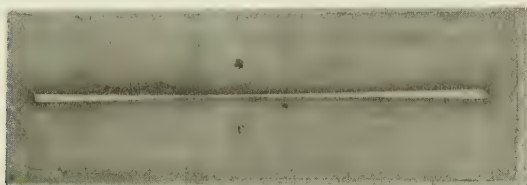


Abb. 9: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nicht erhitzt
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis* auf 100°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*,
absorbiert mit nicht erhitzten Zellen

Mit dem auf 60°C erhitzten Antigen waren anodenwärts nur wenige, und mit dem auf 100°C erhitzten Antigen überhaupt keine Linien nachweisbar, was mit den Ergebnissen vor der Absorption übereinstimmt.

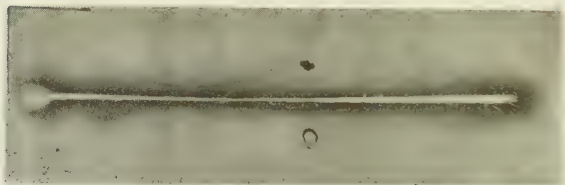


Abb. 10: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nicht erhitzt
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis* auf 60°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*,
absorbiert mit auf 60°C erhitzten Zellen

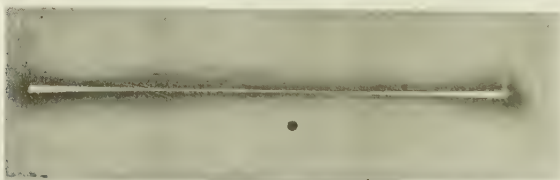


Abb. 11: oben: Homogenisat *C. pseudotropicalis* nicht erhitzt
unten: Homogenisat *C. pseudotropicalis* auf 100°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*,
absorbiert mit auf 60°C erhitzten Zellen

Bei dem Serum, das mit auf 60°C erhitzten Zellen absorbiert worden war, zeigten sich - wie in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt, auf der Anodenseite die gleichen Reaktionen wie vor der Absorption und nach Absorption mit nicht erhitzten Zellen. Auf der Kathodenseite entstand dagegen mit dem nicht erhitzten Homogenisat eine Präzipitationslinie, nicht aber mit den erhitzten Antigenen.

III. Kreuzreaktionen

Um die für *C. pseudotropicalis* spezifischen Antigene von solchen zu unterscheiden, die diese Hefe gemeinsam hat mit anderen Sproßpilzen, führten wir Kreuzreaktionen mit heterologen Sproßpilzen durch. Dabei wählten wir in der Hauptsache Vertreter der Arten aus, die auch TSUCHIYA (1955), BIGUET (1965), POSPISIL (1959) sowie KEMP und SOLOTOROWSKY (1964) bei ihren vergleichenden Untersuchungen an Sproßpilzen berücksichtigten, um eine objektivierbare Ausgangsbasis für den Vergleich der Ergebnisse zu haben.

a) Homogenisat von *C. pseudotropicalis* gegen heterologe Antiseren:

In der ersten Versuchsanordnung brachten wir jeweils das Homogenisat von *C. pseudotropicalis* mit den einzelnen, gegen die ausgewählten Sproßpilze gerichteten Antiseren zusammen. Das Ergebnis veranschaulicht Tabelle 1a. Wie diese zeigt, reagierten - mit Ausnahme des gegen *C. albicans* gerichteten Serums - alle benutzten Immunseren mit einer oder mehreren kathodenwärts auftretenden Linien. Im Vergleich mit dem homologen Serum von *C. pseudotropicalis*, das auf der Kathodenseite mindestens drei Präzipitationslinien ergab, wiesen die gegen *C. curvata* und *C. utilis* gerichteten Seren nur eine Linie auf. Dagegen fanden sich zwei bis drei Präzipitate auf der Kathodenseite mit den Antiseren gegen *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. robusta*, *T. glabrata* und *S. rouxii*.

b) *C. pseudotropicalis*-Serum gegen Homogenisat von heterologen Sproßpilzen:

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Homogenisate einer innerhalb der einzelnen Gattungen erweiterten Zahl von Sproßpilzen mit Hilfe der Immunelektrophorese geprüft. Außerdem verwendeten wir noch je einen Vertreter der Gattungen Schizosaccharomycetaceae und

Tabelle 1a: Kreuzreaktionen zwischen dem Homogenisat von *C. pseudotropicalis* und Antiseren gegen heterologe Sproßpilzarten

	A An	K	A An	K	A An	K	A An	K	A An	K
Antiserum										
Antigen	C. pseudo- tropicalis	+++ ++ +++	C. albicans	tropicalis	C. curvata	C. krusei	C. utilis			
Candida pseudo- tropicalis										
Antiserum	C. stellatoidea		C. robusta	S. rouxii	T. dattila	T. glabrata				
Antigen										
Candida pseudo- tropicalis										

An = Anode

A = Auftragspunkt

K = Kathode

Jedes Kreuz entspricht einer Linie.

Cryptococcaceae. Wir ließen das gegen *C. pseudotropicalis* gerichtete Serum jeweils gegen die Sproßpilzhomogenisate diffundieren. Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 1b zusammengefaßt. Die im Homogenisat von *C. curvata*, *T. glabrata*, *Cr. neoformans* und *Sch. octosporus* enthaltenen Antigene vermochten mit dem gegen *C. pseudotropicalis* gerichteten Serum nicht zu reagieren. Auf der Kathodenseite zeigten die Homogenisate von *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. utilis*, *C. stellatoidea*, *T. inconspicua*, *T. famata* und *S. cerevisiae* jeweils eine Linie, während mit *C. scottii*, *C. robusta*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. reukaufii*, *S. rouxii* und *Rhod. mucilaginosa* zwei Linien entstanden. Bei *C. macedoniensis* war dieselbe Zahl von Antigen-Antikörperpräzipitaten zu beobachten wie mit dem homologen Serum von *C. pseudotropicalis*. Im Gegensatz zur Anordnung in Kapitel IIIa fanden sich auch Präzipitate mit den anodenwärts gewanderten Substanzen: die Homogenisate von *C. scottii*, *C. brumptii* und *C. lipolytica* wiesen ein bis zwei Linien auf; mit *C. macedoniensis* ergab sich auch anodenwärts eine Übereinstimmung in der Zahl der Präzipitationslinien mit *C. pseudotropicalis*. Am Auftragungspunkt reagierten die gegen *C. utilis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *T. dattila* und *S. rouxii* gerichteten Seren mit je einer Präzipitationslinie.

IV. Antigenisolierungen an *C. pseudotropicalis*

Bisher hatten wir nur das Homogenisat von *C. pseudotropicalis*, das die antigenen Substanzen von Zellwänden und Zellinhalt enthält, in der Agar- und Immuoelektrophorese geprüft.

Nach Trennung des Homogenisates durch hochtouriges Zentrifugieren in Zellinhalt und die Zellwände wurden zur Isolierung von Antigenen verschiedene Extraktions- bzw. Fraktionierungsmethoden erprobt.

Tabelle 1b: Kreuzreaktionen zwischen dem Serum gegen *C. pseudotropicalis* und Homogenisaten heterologer Sproßpilze

Antiserum Antigen	C.pseudo- tropicalis		
	An	A	K
<i>C. pseudotropicalis</i>	+++	++	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	+
<i>C. curvata</i>	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	+
<i>C. utilis</i>	-	+	+
<i>C. scottii</i>	++	-	++
<i>C. stellatoidea</i>	-	+	+
<i>C. robusta</i>	-	-	++
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	++
<i>C. brumptii</i>	+	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	+	++
<i>C. reukaufii</i>	-	-	++
<i>C. lipolytica</i>	+	-	-
<i>C. macedoniensis</i>	+++	-	+++
<i>T. inconspicua</i>	-	-	+
<i>T. dattila</i>	-	+	-
<i>T. glabrata</i>	-	-	-
<i>T. famata</i>	-	-	+
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	+
<i>S. rouxii</i>	-	+	++
<i>Cr. neoformans</i>	-	-	-
<i>Rhod. mucilaginosa</i>	-	-	++
<i>Sch. octosporus</i>	-	-	-

An = Anode

A = Auftragspunkt

K = Kathode

Jedes Kreuz bedeutet eine Linie.

a) KOH-Extraktion:

Zuerst untersuchten wir die Zellwände. Bei der Absorption (II, c) mit intakten Zellen werden nur die Antikörper der zur Kathode wandernden Substanzen vollständig absorbiert, wie die Prüfung in der Immunelektrophorese zeigte. Durch Untersuchungen von MÜLLER und HIRSCH (1967) an *C. albicans* und *C. tropicalis* ist bekannt, daß diese antigenen Substanzen Polysaccharide darstellen. Deshalb wandten wir auch zur Extraktion von *C. pseudotropicalis* die KOH-Methode an. Wir unterwarfen die Zellwände jedoch nicht der Extraktion mit heißem Alkali, wie von JONSEN (1955), SEELIGER (1958), SILBEREISEN (1960) u.a. beschrieben, weil - wie in Kap. II, b bereits erwähnt - berücksichtigt werden muß, daß *C. pseudotropicalis* ein thermolabiles Antigen mit Polysaccharidcharakter besitzt (TSUCHIYA 1955, KEMP und SOLOTOROWSKY 1964, BIGUET 1965). Die KOH-Extraktion wurde deshalb gewählt, weil sie in Kälte eine höhere Ausbeute an serologisch aktiver Substanz verspricht als die Phenol-Wasser-Extraktion (MÜLLER 1967). Die an die KOH-Extraktion sich anschließende Alkoholfällung erbrachte einen weißlich-flockigen Niederschlag, der wasserlöslich war und sich auch in physiologischer Kochsalzlösung löste. Dieser Niederschlag wurde für die Immunelektrophorese in Aqua dest. aufgenommen. Wir verwendeten den unerhitzten und den eine Stunde auf 100°C erhitzten Extrakt. Wie die Abbildung 12 zeigt, ergab der Präzipitationsversuch des nicht erhitzten und auf 100°C erhitzten Extraktes mit dem gegen *C. pseudotropicalis* gerichteten Immunserum keinen sichtbaren Unterschied in der Zahl der Präzipitationsbänder. In beiden Fällen erscheint auf der Kathodenseite eine kräftige Präzipitationslinie, die an den Enden leicht auffasert. Auf der Anodenseite ist, wie zu erwarten, keine Präzipitation erfolgt.

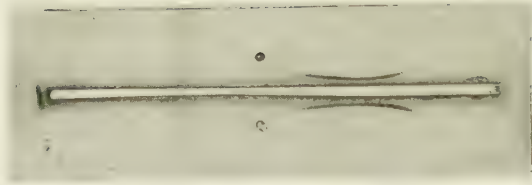


Abb. 12: oben: Zellwände nach KOH-Extraktion nicht erhitzt
unten: Zellwände nach KOH-Extraktion auf 100°C erhitzt
Serum: homologes Antiserum von *C. pseudotropicalis*

b) Ammoniumsulfatfällung:

Nach Untersuchungen von BIGUET (1962) sowie MÜLLER und KRANENBERG (1967) enthalten die Sproßpilze Glycoprotein- und Eiweißantigene. Nach MÜLLER und HIRSCH (1967) sowie MÜLLER und DUPONT (1967) sind die Eiweißantigene bei *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. krusei* nur im Zellinhalt lokalisiert. Da wir in den Zellwänden von *C. pseudotropicalis* nur eine PAS-positive, zur Kathode wandernde Antigengruppe nachweisen konnten, ist die Annahme gerechtfertigt, daß auch bei *C. pseudotropicalis* die Eiweißantigene nur im Zellinhalt vorkommen. Versuche zur Isolierung von Eiweißantigenen wurden deshalb am Zellinhalt von *C. pseudotropicalis* durchgeführt.

Aufgrund der chemischen Eigenschaften von Eiweißen bot sich zur Fraktionierung der antigenen Substanzen das von MÜLLER und STOLZENBACH (1967) mit Erfolg durchgeführte Aussalzen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung an. Wir begannen mit einer Halbsättigung des Inhalts. Nach vier Stunden erhielten wir im allgemeinen eine geringe Menge von gelblich-weißem Niederschlag, der sich abzentrifugieren ließ und zum größten Teil in Wasser unlöslich war. Der Überstand dieser Fällung wurde ebenfalls mit Ammoniumsulfat auf 90 % abgesättigt. Der hierbei entstandene Niederschlag war ebenfalls weißlich gefärbt, flockig und sein Hauptanteil wasserlöslich. Der nach Abzentrifugieren des Niederschlags als dritte Fraktion erhaltene Überstand blieb klar.

Alle drei Fraktionen, die wir durch Fällung mit gesättigten Ammoniumsulfat erhalten hatten, prüften wir in der Agar- und Immunelektrophorese. Außerdem immunisierten wir Kaninchen mit den einzelnen Fraktionen, um ihre Antigenität zu prüfen und um Antiseren zu gewinnen.

1. Agarelektrophorese: Nach 50%iger Ammoniumsulfatfällung des Inhaltes war auf der Kathodenseite noch eine schmale, kräftig gefärbte Bande sichtbar, die ihrer Lage nach, verglichen mit dem Vollantigen, etwa dem Mittelstück desselben auf der Kathodenseite entsprach. Die Substanz war also deutlich vom Graben abgerückt. Am Ende dieser Bande lag noch ein ganz zarter Ausläufer ungefähr im Bereich der am schnellsten wandernden Fraktion des Vollantigens. Verglichen mit dem Homogenisat scheint die PAS-positive Substanz des Niederschlages nach Halbsättigung mit Ammosiumsulfat also verringert. Mit Amidoschwarz ließ sich - vermutlich infolge Denaturierung - keine Bande erzielen. (Siehe Abbildung 13.)



Abb. 13: Niederschlag nach 50%iger Ammoniumsulfatfällung (PAS)

Auch mit dem Niederschlag nach 90%iger Absättigung mit Ammoniumsulfat erschien - deutlich vom Graben entfernt - eine etwa gleich breite Bande mit PAS wie bei dem Niederschlag der Halbsättigung. Hier ließ sich jedoch außerdem anodenwärts eine sehr schnell wandernde Fraktion mit Amidoschwarz darstellen. (Siehe Abbildungen 14 und 15.)

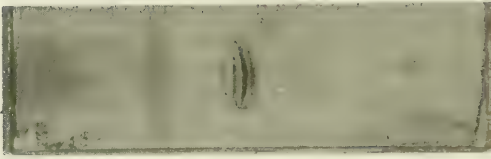


Abb. 14: Niederschlag nach 90%iger Sättigung
mit Ammoniumsulfat (Amidoschwarz)



Abb. 15: Niederschlag nach 90%iger Sättigung
mit Ammoniumsulfat (PAS)

Der Überstand der Fraktionierung enthielt erwartungs-
gemäß nur noch PAS-positive Substanzen in einer Ban-
de, die mit der des 50%igen Niederschlags auf glei-
cher Höhe lag und etwa dasselbe Ausmaß hatte (s.
Abbildung 16).



Abb. 16: Überstand nach 90%iger Sättigung
mit Ammoniumsulfat (PAS)

2. Immunelektrophorese: Zur Vereinfachung bei der Bezeichnung der einzelnen Fraktionen und deren Antisera seien folgende Abkürzungen vorausgeschickt:

- | | |
|---|--------------|
| a. Niederschlag nach 50%iger Ammoniumsulfatfällung: | Fraktion I |
| b. Niederschlag nach 90%iger Ammoniumsulfatfällung: | Fraktion II |
| c. Überstand nach 90%iger Ammoniumsulfatfällung: | Fraktion III |

Die gegen die Fraktionen gerichteten Sera werden analog mit Fraktionsserum I - III bezeichnet.

Die Immunelektrophorese sollte Aufschluß geben, inwieweit die Fällungen mit Ammoniumsulfat eine Fraktionierung der antigenen Substanz darstellen.

Nach der 50%igen Sättigung zeigte sich anodenwärts, wie schon in der Agarelektrophorese, keine Reaktion mit dem gegen *C. pseudotropicalis* gerichteten Serum. Dagegen waren auf der Kathodenseite mit demselben Serum Präzipitationslinien nachweisbar, jedoch im Vergleich zum Homogenisat von *C. pseudotropicalis* eine Linie weniger. Am Auftragspunkt war keine Bande nachweisbar.

Zwischen der 90%igen Fällung, also der Fraktion II, und dem Homogenisat ist mit dem homologen Serum von *C. pseudotropicalis* auf der Anodenseite kein Unterschied erkennbar. Ebenso sind auch auf der Kathodenseite zwei bis drei Linien nachweisbar, die schon mit dem Homogenisat gefunden wurden. Am Auftragspunkt bildete die Fraktion II eine Linie weniger als das Homogenisat.

Fraktion III hat erwartungsgemäß auf der Anodenseite keine Präzipitationsbänder mehr aufzuweisen; dasselbe trifft für den Auftragspunkt zu. Kathodenwärts ist gegen das Antiserum von *C. pseudotropicalis* eine Linie sichtbar.

3. Immunisierungsversuche mit den Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung: Die Immunisierung mit den drei Fraktionen führte in jedem Fall, also auch bei Fraktion II, zur Antikörperbildung. Während wir bei Verwendung von Fraktion I als Antigen in der Immunelektrophorese anodenwärts keine Präzipitation nachweisen konnten, zeigte Fraktionsserum I mit dem C.-pseudotropicalis-Homogenisat zwei Präzipitationslinien auf der Anodenseite, Fraktionsserum II dagegen nur eine. Auf der Kathodenseite stellte sich mit beiden Fraktionsseren eine Linie dar. Das Serum gegen Fraktion III zeigt nur auf der Kathodenseite eine Präzipitationslinie. Die Kreuzreaktionen zwischen den drei Fraktionen und den gegen sie gerichteten Seren zeigten, daß alle drei Seren mit den kathodenwärts wandernden Antigenen aller drei Fraktionen reagieren. Ferner stellte sich mit dem Serum gegen Fraktion I und der Fraktion II sowie auch umgekehrt mit dem Serum gegen Fraktion II und der Fraktion I eine Präzipitationslinie dar (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Kreuzreaktionen des Homogenisates und der einzelnen Fraktionen von C.pseudotropicalis mit den gegen sie gerichteten Antiseren

Antiserum	C. pseudo- tropicalis			F r a k t i o n								
				I			II			III		
Antigen	An	A	K	An	A	K	An	A	K	An	A	K
C. pseudo- tropicalis	+++	++	+++	++	-	+	+	-	+	-	-	+
Fraktion I	-	-	++	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Fraktion II	+++	+	+++	++	-	+	+	-	+	-	-	+
Fraktion III	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

An = Anode; A = Auftragspunkt; K = Kathode.
Jedes Kreuz entspricht einer Linie.

V. Kreuzreaktionen mit fraktioniertem Antigen von C. pseudotropicalis

Die Prüfung der Fraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung gegen homologes Serum von C. pseudotropicalis in der Immunelektrophorese und die Immunisierung mit diesen Fraktionen hatten ergeben, daß sie serologisch aktiv sind. Diese Fällungsprodukte bzw. die gegen sie gerichteten Seren wurden auf Kreuzreaktionen mit heterologen Sproßpilzen untersucht.

a) Ammoniumsulfatfraktionen gegen heterologe Seren:

Während das Homogenisat von C. pseudotropicalis mit allen verwendeten Seren (Ausnahme: das gegen C. albicans gerichtete Serum) auf der Kathodenseite Präzipitate bildete, reagierte die Fraktion I, wie aus Tabelle 3a hervorgeht, nicht mit dem gegen C. albicans, C. tropicalis, C. curvata und C. utilis gerichteten Seren. Mit den anderen Seren entstand eine Linie auf der Kathodenseite: C. krusei, C. stellatoidea, C. robusta und S. rouxii bzw. zwei mit T. dattila und T. glabrata. Anodenwärts reagierte keines der verwendeten Seren sowohl mit dem Homogenisat als auch mit Fraktion I. Fraktion II reagierte ebenfalls nicht mit den gegen C. albicans, C. tropicalis und C. utilis gerichteten Seren, während das Antiserum von C. curvata mit dieser Fraktion sowie mit dem Homogenisat eine Linie auf der Kathodenseite aufwies. Ebenfalls eine Linie bildeten die Seren gegen C. krusei, C. stellatoidea und S. rouxii mit der Fraktion II entsprechend dem Ergebnis mit Fraktion I. Dagegen wiesen die Seren gegen T. dattila und T. glabrata gegenüber den Ergebnissen mit Fraktion I eine Linie weniger auf. Das Antiserum gegen C. robusta reagierte mit Fraktion II mit derselben Zahl Linien wie mit dem Homogenisat von C. pseudotropicalis, nämlich drei zur Kathode, eine am Auftragspunkt. Anodenwärts waren auch bei dieser Fraktion keine Antigen-Antikörperbindungen erfolgt. Mit der Fraktion III wurden, wie Tabelle 3a zeigt, die gleichen Präzipitationsergebnisse wie mit Fraktion I erzielt.

Tabelle 3a: Kreuzreaktionen zwischen den Ammoniumsulfatfraktionen von C. pseudotropicalis und heterologen Immunseren.

Antiserum	C. albicans	C. tropicalis	C. curvata	C. kru-sei	C. utilis	C. stellatoidea	C. robusta	C. dattila	C. glabrata	C. rouxii
	An A K	An A K	An A K	An A K	An A K	An A K	An A K	An A K	An A K	An A K
C. pseudotropicalis Fraktion I Fraktion II Fraktion III	- - -	- - +	- - +	- - +++	- - +	- - ++	- + +++	- - +++	- - ++	- - ++
	- - -	- - -	- - -	- - +	- - -	- - +	- - +	- - ++	- - ++	- - +
	- - -	- - -	- - +	- - +	- - -	- - +	- + +++	- - +	- - +	- - +
	- - -	- - -	- - -	- - +	- - -	- - +	- - +	- - ++	- - ++	- - +

An = Anode; A = Auftragspunkt; K = Kathode.
Jedes Kreuz entspricht einer Linie.

b) Seren der Ammoniumsulfatfraktionen gegen heterologe Sproßpilzhomogenisate:

Die Homogenisate von *C. utilis*, *C. robusta*, *C. parapsilosis*, *C. brumptii*, *C. reukaufii*, *T. dattila*, *T. famata*, *S. rouxii*, *Cr. neoformans*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *Sch. octosporus* zeigten - wie aus Tabelle 3b hervorgeht - mit keinem gegen die 3 Fraktionen gerichteten Seren eine Reaktion, obgleich diese Hefen (mit Ausnahme von *Cr. neoformans* und *Sch. octosporus*) mit dem Antiserum gegen das Homogenisat von *C. pseudotropicalis* reagiert hatten.

Mit Fraktionsserum I ergaben kathodenwärts nur die Homogenisate von *C. scottii* und *C. macedoniensis* eine bzw. zwei Linien. Die Homogenisate von *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. scottii*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *T. glabrata* und *S. cerevisiae* präzipitierten das Serum am Auftragspunkt.

Während bei der Prüfung der heterologen Seren mit den Fraktionen I - III keine Präzipitationen auf der Anodenseite erfolgt waren, besaß das Serum gegen Fraktion I Antikörper, die mit den zur Anode wandernden Antigenen von *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii* und *C. lipolytica* eine Linie, mit *C. scottii* und *C. macedoniensis* zwei Linien bildeten. Auch das Serum gegen die Fraktion II enthielt Antikörper, die mit den anodenwärts wandernden Antigenen von *C. tropicalis*, *C. scottii*, *C. stellatoidea* und *C. macedoniensis* reagierten. Zusätzlich entstand eine Linie auf der Anodenseite mit *T. glabrata*-Antigen.

Außerdem wiesen zur Kathode wandernde Antigene von *C. scottii*, *C. macedoniensis* und *T. glabrata* Präzipitationen mit den im Serum gegen Fraktion II enthaltenen entsprechenden Antikörpern auf. Am Auftragspunkt entstand in keinem Fall eine Immunpräzipitation.

Wie zu erwarten, enthielt das Serum gegen Fraktion III nur Antikörper gegen kathodenwärts wandernde Antigene; das Serum mit *C. scottii*, *C. macedoniensis* und *T. inconspicua* eine, mit *T. glabrata* zwei Präzipitationslinien.

Tabelle 3b: Seren der Ammoniumsulfatfraktionen gegen
heterologe Sproßspilz-Homogenisate.

Antiserum Antigen	C. pseudo- tropicalis			F r a k t i o n								
				I			II			III		
	An	A	K	An	A	K	An	A	K	An	A	K
C. pseudotropicalis	+++	++	+++	++	-	+	++	-	+	+	-	+
C. albicans	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C. tropicalis	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
C. curvata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. krusei	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C. utilis	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. scottii	++	-	++	++	+	+	+	-	+	-	-	+
C. stellatoidea	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
C. robusta	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. parapsilosis	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. brumptii	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. guilliermondii	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C. reukaufii	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. lipolytica	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C. macedoniensis	+++	-	+++	++	-	++	++	-	+	-	-	+
T. inconspicua	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
T. dattila	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T. glabrata	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
T. famata	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. cerevisiae	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S. rouxii	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr. neoformans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhod. mucilaginosus	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sch. octosporus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

An = Anode; A = Auftragspunkt; K = Kathode.
Jedes Kreuz entspricht einer Linie.

D. Diskussion

=====

Ebenso wie bei *C. albicans* und *C. tropicalis* (MÜLLER und HIRSCH 1967) sowie *C. krusei* (MÜLLER und DUPONT 1967) waren auch im Homogenisat von *C. pseudotropicalis* zwei unterschiedliche Substanzgruppen nachweisbar. Eine Gruppe wanderte in der Agarelektrophorese zur Anode und ließ sich mit Amidoschwarz anfärben, die andere wanderte zur Kathode und war mit PAS darstellbar. Während die Amidoschwarzfärbung eine gleichmäßige Bande auf der Anodenseite zeigte, wurde durch PAS-Färbung eine Auftrennung in mehrere Fraktionen angedeutet. Aufgrund der Färbungen dürfte es sich bei den zur Anode wandernden Substanzen um Proteine, bei den zur Kathode wandernden um Polysaccharide bzw. Glycoproteine handeln.

Die Prüfung des Homogenisates in der Immunelektrophorese mit seinem homologen Antiserum ergab, daß beide Substanzgruppen antigene Eigenschaften besitzen. Soweit die mäßige elektrophoretische Auftrennung der Glycoproteinantigene eine Aussage erlaubt, konnten insgesamt etwa zehn Antigene nachgewiesen werden. Diese Feststellung stimmt im großen und ganzen mit den Untersuchungen BIGUETS (1965) überein, der zwölf Antigene zur Darstellung brachte. Dagegen erfaßte TSUCHIYA (1955) nur fünf thermostabile und ein thermolabiles Antigen. Diese Diskrepanz ist sicherlich methodisch bedingt, weil TSUCHIYA zum Nachweis der Antigene seine Antiseren mit heterologen Hefearten, und zwar mit intakten Zellen, absorbierte. Mit dieser Methode können aber nur Zellwandantigene erfaßt werden (MÜLLER und HIRSCH 1967).

Unsere Agglutinationsversuche mit nicht erhitzten und erhitzten Zellen von *C. pseudotropicalis* wiesen durch eine Titerdifferenz auf das Vorhandensein von thermolabilen Antigenen hin, die bereits TSUCHIYA (1955), POSPISIL (1959) sowie KEMP

und SOLOTOROWSKY (1964) nachgewiesen hatten. Das mit erhitzten Zellen absorbierte Serum zeigte in der Immunelektrophorese gegen nicht erhitztes Homogenisat auf der Kathodenseite deutlich einen Restantikörper, der gegen auf 60°C erhitztes Homogenisat nicht nachweisbar war. Diese Beobachtung spricht dafür, daß sich unter den Glycoproteinantigenen ein bei 60°C thermolabiles Antigen befindet.

Im Gegensatz zu KEMP und SOLOTOROWSKY (1964), die dieses thermolabile Antigen nur im Zellinhalt fanden, sind wir der Ansicht, daß es sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden lokalisiert ist. Wir hätten sonst auch bei Absorption mit intakten, nicht erhitzten Zellen einen Restantikörper auf der Kathodenseite zurückbehalten müssen, was aber nicht der Fall war. Möglicherweise wurde das thermolabile Antigen der Zellwände bei der Aufbereitung von KEMP und SOLOTOROWSKY denaturiert. Wir konnten nämlich nach KOH-Extraktion der Zellwände das thermolabile Antigen nicht mehr eindeutig nachweisen.

Weitere, bisher unbekannte thermolabile Antigene unter den Eiweißantigenen konnten durch Verwendung von auf 60°C erhitztem Homogenisat in der Immunelektrophorese identifiziert werden. Nach Erhitzen auf 100°C zeigten alle Eiweißantigene keine serologische Reaktion mehr, vermutlich durch Denaturierung.

Bei den Kreuzreaktionen zwischen *C. pseudotropicalis* und anderen ausgewählten Hefen ergab sich eine Trennung in zwei Gruppen: einerseits schwache Reaktionen in Form einer, höchstens zweier Präzipitationen auf der Kathodenseite, am Auftragspunkt oder anodenwärts, andererseits massierte Reaktionen in mehreren, auf der Kathoden- und Anodenseite sichtbaren Linien. Eine auffallende Verwandtschaft besteht zu *C. macedoniensis*. Dies berichten auch JONSEN (1955), SEELIGER (1958), WINDISCH (1961) und BIGUET (1965), die beide Hefen derselben Serogruppe zuordnen. Mehrere gemeinsame Antigene zeigten sich auch mit *C. krusei*, *C. scottii*, *C. stellatoidea*, *C. robusta*, *C. parapsilosis*, *C. reukaufii*, *C. guilliermondii*, *T. dattila*, *T. glabrata* und *S. rouxii*. Während die Antigenverwandtschaft von *C. pseudotropicalis* mit *C. macedoniensis* und *C. scottii* sich auf gemeinsame Eiweiß- und Glycoproteinantigene gründet, bezieht sich die Antigengemeinschaft der übrigen Hefen nur auf Antigene

mit Polysaccharidcharakter, also Präzipitate der Kathodenseite. Bei einigen Hefen divergierte die Zahl der Präzipitate in der Immunelektrophorese, abhängig davon, ob deren Serum mit dem Homogenisat von *C. pseudotropicalis* oder deren Homogenisat mit dem Antiserum von *C. pseudotropicalis* gekreuzt wurden: Dies traf bei *C. krusei*, *C. utilis*, *C. robusta*, *T. dattila* und *T. glabrata* zu. Sie alle zeigten bei der Immunelektrophorese ihrer Seren gegen *C. pseudotropicalis*-Homogenisat ein bis zwei Linien mehr als in der umgekehrten Anordnung. Dies ist wohl dadurch zu erklären, daß bei Verwendung einer großen Zahl von Antigenen beim Tier nur Antikörper gegen die stärksten Antigene gebildet werden, bzw. die Antikörpertiter gegen die einzelnen Antigene unterschiedlich ausgeprägt sind.

Mit *Cr. neoformans* und *Sch. octosporus* konnten keinerlei Antigengemeinschaften gefunden werden.

Die von uns nachgewiesene Antigenverwandtschaft zwischen *C. pseudotropicalis* und den anderen untersuchten Sproßpilzen stimmen weitgehend mit den Befunden anderer Autoren überein (SEELIGER 1958, POSPISIL 1959, BIGUET 1965, TSUCHIYA 1965). Geringe Differenzen in der Zahl der Präzipitationsreaktionen lassen sich einerseits durch individuell unterschiedliches Ansprechen der Tiere auf Antigengaben, andererseits durch serologische Typen der Hefearten, wie sie bereits bei *C. albicans* nachgewiesen wurden, erklären. So fanden wir z.B. zwei gemeinsame Antigene bei *C. pseudotropicalis* und *C. krusei*, während POSPISIL (1959) und BIGUET (1965) nur ein gemeinsames Antigen nachweisen konnten. Andererseits fanden wir bei einigen Hefen ein gemeinsames Antigen mit *C. pseudotropicalis* weniger als TSUCHIYA (1965).

Abweichend von TSUCHIYA (1965) - er gibt zwei gemeinsame Antigene zwischen *C. pseudotropicalis* und *Cr. neoformans* an - konnten wir auch keine Antigengemeinschaft zwischen diesen beiden Hefen feststellen. Hier stimmen unsere Befunde mit denen von SEELIGER (1958) überein.

Während die Zellwandantigene, d.h. also die Polysaccharid- bzw. Glycoproteinantigene, bereits eingehend studiert sind (JONSEN 1955, SEELIGER 1958, POSPISIL 1959, TSUCHIYA 1965),

wurden die Eiweißantigene der Hefen, vor allem in Bezug auf Kreuzreaktionen, vernachlässigt. Da die Immunisierung von Tieren mit einer großen Zahl von Antigenen offensichtlich ungünstig ist, wurde der Versuch unternommen, das Antigen-gemisch von *C. pseudotropicalis* aufzutrennen, um mit wenigen Antigenen immunisieren zu können. Es wurde deshalb, analog den Untersuchungen von MÜLLER und STOLZENBACH (1967) an *C. albicans*, die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung angewendet. Dabei ergaben sich wie bei *C. albicans* mit ansteigender Sättigung drei Fraktionen. Der Niederschlag der 50%igen Sättigung war weißlich-flockig, zum größten Teil in Wasser unlöslich und in Hitze nicht koagulierbar. Es dürfte sich hierbei um das Zymocasein der Hefen handeln, das als typisches Globulin zusammen mit einem Albumin als einziges definiertes Protein bisher aus den Hefen isoliert worden ist (BRUNNER 1960).

Aus der 90%igen Absättigung resultierte ein ebenfalls feinflockiger, weißlicher Niederschlag, der größtenteils in Wasser löslich und bei 40°C in Hitze koagulierbar war. Aufgrund dieser Eigenschaften dürfte es sich um das oben erwähnte Protein Cerevisin handeln, das in seinen Eigenschaften albumin-ähnlich ist.

Die dritte Fraktion bestand aus dem klaren Überstand der 90%igen Sättigung.

Die Agarelektrophorese beider Niederschläge ergab, daß im 90%igen Niederschlag neben Eiweißstoffen, die wir mit Amidoschwarz charakterisieren konnten, auch bereits Polysaccharide mitgefällt waren, die sich mit PAS-Färbung nachweisen ließen. Der Überstand enthielt die Hauptmenge der PAS-positiven Substanzen, also Polysaccharide, und war frei von Eiweißstoffen. Die Immunelektrophorese zeigte, daß alle drei Fraktionen serologisch aktiv waren. Sie bestätigte außerdem unsere Ergebnisse aus der Agarelektrophorese. Die Eiweißantigene des 50%igen Niederschlags scheinen nach Ammoniumsulfatfällung denaturiert zu sein, da sie auf der Anodenseite - im Gegensatz zu dem Niederschlag nach 90%iger Fällung - keine Präzipitate bildeten. Mit dem Überstand nach 90%iger Absättigung ergaben sich ausschließlich Präzipitate auf der

Kathodenseite; er enthielt also nur Polysaccharidantigene.

Alle drei Fraktionen riefen, wie die Immunelektrophorese bestätigte, bei den Immunisierungsversuchen an Kaninchen Antikörperbildung hervor. Dabei ergaben sich bei der Prüfung von Fraktionsserum I gegen den 90%igen Niederschlag gemeinsame Antigene auf der Anoden- und Kathodenseite (vgl. Tabelle 2). Dieser Nachweis war mit dem 50%igen Niederschlag als Antigen nicht möglich, da speziell seine Eiweißantigene durch die Behandlung mit Ammoniumsulfat denaturiert schienen. Er induzierte bei Kaninchen Antikörper, die in der Immunelektrophorese sowohl mit dem Niederschlag der 50%igen als auch 90%igen Ammoniumsulfatfällung Antigen-Antikörperreaktionen ergaben, d.h. daß auch schon im 50%igen Niederschlag Spuren von antigenem Material der 90%igen Fällung vorhanden waren. Wenn auch mit dieser Fraktionierung, wie der Vergleich der Kreuzreaktionen des Homogenisatserums einerseits und der Fraktionsseren andererseits gegen heterologe Sproßpilze zeigt, nicht alle Antigene erfaßt werden (so z.B. reagierten nicht mit den Fraktionsseren *C. utilis*, *C. robusta*, *C. parapsilosis*, *C. brumptii*, *C. reukaufii*, *T. dattila*, *T. famata*, *S. rouxii* und *Rhod. mucilaginosus*), konnten andererseits mehr Antigene als mit dem Homogenisat erfaßt werden (z.B. ergab *T. glabrata* nur mit den einzelnen Fraktionsseren sowohl anoden- als auch kathodenwärts Antigen-Antikörperreaktionen).

Das Antiserum gegen Fraktion II, also den 90%igen Niederschlag, wurde zur Feststellung gemeinsamer Eiweißantigene mit den heterologen Sproßpilzen gekreuzt. Dabei stellten sich mit *C. macedoniensis* und *C. scottii* ein bzw. zwei gemeinsame Eiweißantigene dar. Mit *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* und *T. glabrata* ergaben sich zusätzliche Antigengemeinschaften, die mit dem Homogenisatserum von *C. pseudotropicalis* überhaupt nicht erfaßt worden waren. Dieses Ergebnis stützt unsere Vermutung, daß bei einer Immunisierung mit einer großen Zahl von Antigenen nicht gegen alle auch Antikörper in nachweisbarer Menge gebildet werden.

E. Zusammenfassung

=====

Unter den für Menschen und verschiedene Tierspezies pathogenen bzw. fakultativ pathogenen Pilzen haben die Arten der Candidagruppe als Ursache für Primär- und Sekundärinfektionen in Europa die größte Bedeutung.

Zu den fakultativ pathogenen Arten gehört auch *C. pseudotropicalis*, die in der Literatur sogar als Erreger lebensbedrohlicher Zustände genannt wird. Ihre Antigenstruktur und Verwandtschaft mit anderen Sproßpilzarten sind Thema der vorliegenden Arbeit.

Das Zellhomogenisat von *C. pseudotropicalis* wurde in der Agar- und Immunelektrophorese auf seine serologischen Eigenschaften geprüft. Es zeigte in der Agarelektrophorese eine Auftrennung in eine zur Kathode wandernde PAS-positive Substanzgruppe, bei der es sich um Polysaccharide handelt, und eine anodenwärts wandernde, mit Amidoschwarz markierbare Stoffgruppe, die Proteine enthält. Am Auftragspunkt fanden sich unlösliche, im elektrischen Feld unbewegliche Anteile beider Substanzgruppen.

In der Immunelektrophorese erwiesen sich beide Gruppen als serologisch aktiv und induzierten im Tierversuch Antikörperbildung. Bei einer Reaktion zwischen dem gegen das Homogenisat von *C. pseudotropicalis* gerichteten Antiserum und dem Homogenisat als Antigen konnten mindestens zehn Antigen-Antikörperkomplexe nachgewiesen werden. Die zur Anode wandernden Eiweißantigene waren nur im Zellinhalt nachweisbar, dagegen die zur Kathode wandernden Glykoproteinantigene sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden. Von diesen zehn Antigenen erwiesen sich mehrere Eiweiß- und ein Polysaccharidantigen bei 60°C als thermolabil. Während die hitzelabilen Eiweißantigene nur im Zellinhalt lokalisiert sind, war das thermolabile Polysaccharidantigen sowohl im Zellinhalt

als auch in den Zellwänden nachweisbar; bei Erhitzen auf 100°C wurden alle Eiweißantigene denaturiert.

Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung des Zellinhaltes ergaben sich drei Fraktionen. Der 50%ige Niederschlag, dessen Eiweißanteile in der Immunelektrophorese keine serologische Aktivität zeigten, führte aber im Tierversuch zur Antikörperbildung. Der 90%ige Niederschlag war in vitro und in vivo serologisch aktiv. Beide Niederschläge enthielten auch Spuren serologisch aktiver Polysaccharide bzw. Glycoproteine, die - wie die Kreuzreaktionen zwischen den drei Fraktionen ergaben - mit denen des Überstandes identisch waren. Bei 50%iger Ammoniumsulfatfällung wurde bereits ein - wenn auch geringer - Teil der bei 90%iger Sättigung ausfallenden Eiweiße mitgerissen. In dem Überstand nach 90%iger Fällung waren keine Eiweiße mehr nachweisbar.

Der Vergleich von *C. pseudotropicalis* mit anderen Sproßpilzarten in der Immunelektrophorese ergab eine enge Antigengemeinschaft zwischen *C. pseudotropicalis* und *C. macedonensis*. Nahe Verwandtschaft mit diesen Hefen zeigte auch *C. scottii*. Andere Arten, z.B. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. utilis*, *C. stellatoidea*, *C. robusta*, *C. parapsilosis*, *C. brumptii*, *C. guilliermondii*, *C. reukauffii*, *C. lipolytica*, *T. inconspicua*, *T. dattila*, *T. famata*, *S. cerevisiae*, *S. rouxii* und *Rhod. mucilaginosa* hatten nur ein bis drei Antigene mit *C. pseudotropicalis* gemeinsam. Zusätzliche antigene Beziehungen konnten durch Verwendung von gegen die Fraktionen gerichteten Antiseren erkannt werden. So reagierte *T. glabrata* mit den Fraktionsseren I - III. *C. tropicalis* zeigte mit Fraktionsserum I ein Antigen mehr als mit dem gegen das Homogenisat von *C. pseudotropicalis* gerichteten Serum.

F. Literatur

=====

BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S.:

Étude électrophorétique et immunochimique comparée des antigènes De Quelques levures du genre *Candida* (*C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*).

Mycopath. et Mycopath. appl. 17, 239-254 (1962)

BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S., FRUIT, J.:

Analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques et systématique des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses.

Mycopath. et Mycopath. appl. 26, 241-256 (1965)

BROWN et al.: zitiert nach CONN et al.

BRUNNER, R.: Die Hefen in der Wissenschaft.

Verlag Hans Carl, Nürnberg (1960)

CONN, N.K., CREAN, G.P., MACCABE, A.F., McLEAN, N.:

Systemic candidiasis and endocarditis due *C. tropicalis*.

Brit. Med. J. I, 944-947 (1959)

GRABAR, P.: Immunelektrophoretische Analyse.

Behringwerk-Mitteilungen 30, 23-41 (1955)

HIATT, J.S., MARTIN, D.S.: Recovery from pulmonary moniliasis following serum-therapie.

J. Amer. Med. Ass. 130, 205-209 (1946)

HIGUCHI, K., IWASAKI, H.: Systemic Candidiasis complicated with Leukaemia. In: "Studies on Candidiasis in Japan", Research Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan, 176-182 (1961)

- JONSEN, J.: Serologic studies in genus *Candida*.
Thesis Oslo (1955)
- KEMP, G., SOLOTOROWSKY, M.: Localisation of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera *Candida* and *Torulopsis*.
J. Immunol. 93, 305-314 (1964)
- KLIGMANN, A.M., DELAMATER, E.D.:
The immunology of the human mycoses.
Ann. Rev. Microbiol. 4, 283-312 (1950)
- KLOSE, F., SCHÜRMANN, R.:
Experimentelle Untersuchungen über Soormycose.
Z. Hyg. 134, 63-77 (1952)
- LODDER, J., KREGER VON RIJ:
The yeasts, a taxonomic study.
North Holland Publish Co., Amsterdam (1952)
- MICHAELIS, L.: *Biochem. Z.* 139, 234 (1931)
- MÜLLER, H.-L.: Untersuchungen zur Antigenstruktur von Sproßpilzen.
Habilitationsschrift Marburg (1967)
- MÜLLER, H.-L., HIRSCH, M.: Zur Antigenstruktur von *C. albicans* und *C. tropicalis*.
4. Mitteilung: Agar- und immunelektrophoretische Studien an Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I Orig. 202, 247-255 (1967)
- MÜLLER, H.-L., KRANENBERG, K.: Untersuchungen über Antigen-gemeinschaften zwischen hefeartigen Pilzen.
Mycopath. et Mycopath. appl. (im Druck)
- MÜLLER, H.-L., DUPONT, H.:
Zellwand- und Zellinhaltantigene von *C. krusei*.
Zbl. Bakt. I Orig. (im Druck)
- MÜLLER, H.-L., STOLZENBACH, G.: Versuch zur Isolierung von Antigenen aus *C. albicans*.
Zbl. Bakt. I Orig. (im Druck)

- POLEMANN, G., WEGMANN, T., STÄMLER, A.:
Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten.
Thieme Verlag, Stuttgart (1961)
- POSPISIL, L.: Agglutination, KBR und Hämagglutinations-
reaktion bei der Bestimmung von Candidaarten.
Dermatol. 118, 65-73 (1959)
- SCHABINSKI, G.: Grundriß der medizinischen Mycologie.
VEB Fischer, Jena (1960)
- SCHEIDEGGER, J.U.: Une Micro-Méthode de l'Immunélectrophorèse.
Internat. Arch. Allergy 7, 103-110 (1955)
- SCHERREIN, C., RIETH, H.: Hefepilze als Krankheitserreger
bei Mensch und Tier.
Springer Verlag, Berlin (1963)
- SEELIGER, H.P.R.: Mycologische Serodiagnostik.
J.A. Barth Verlag, Leipzig (1958)
- SEELIGER, H.P.R.: Serodiagnostik der Pilze und mycotischen
Infektionen.
Zbl. Bakt. I Orig. 184, 194-197 (1962)
- SILBEREISEN, K.: Hefen in der Wissenschaft.
Verlag Hans Carl, Nürnberg (1960)
- SKOBEL, P.: zitiert nach CONN et al.
- SKOBEL, P., YORKE, D., SCHABINSKI, G.: Akute generalisierte
Mycose (Sepsis durch *C. pseudotropicalis*).
Münch. med. Wschr. 97, 194-197 (1955)
- TSUCHIYA, F., FUKAZAWA, Y., MYASAKI, F., KAWAKITA, S.:
Studies on the classification of the genus *Candida*
(III): thermolabile and thermostabile antigens of
the seven species of the genus *Candida*.
Jap. J. Exp. Med. 25, 75-83 (1955)
- WEINGART et al.: zitiert nach CONN et al.
- WINDISCH, S.: Die Hefen in der Wissenschaft.
Verlag Hans Carl, Nürnberg (1960)

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert,
Direktor des Hygiene-Instituts Marburg,
danke ich für die Überlassung des The-
mas und des Arbeitsplatzes.

Frau Dr. med. H.-L. Müller danke ich
herzlich für ihre uneingeschränkte
Beratung und Hilfsbereitschaft bei
der Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 8. Oktober 1940 wurde ich als Tochter des Pfarrers Hans Beck und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Rothkegel, in Berlin-Schöneberg geboren.

Nach unserer Flucht zu Beginn des Jahres 1945 aus unserem Evakuierungsort Vietz an der Ostbahn kamen wir zunächst nach Metzingen in Württemberg, wo ich im September des Jahres 1946 eingeschult wurde. Nach vier Grundschuljahren bestand ich die Aufnahmeprüfung zur dortigen höheren Schule. Nach einem Vierteljahr zogen wir nach Mannheim, wo ich meinen Schulbesuch am altsprachlichen Karl-Friedrich-Gymnasium fortsetzte. Im Jahre 1956 wechselte ich nochmals durch Umzug die Schule und besuchte nun das staatl. altsprachl. hum. Gymnasium für Jungen in Köln-Mülheim. Dort legte ich am 4. März 1959 meine Reifeprüfung ab.

Nach dem Abitur nahm ich in Kassel-Wilhelmshöhe an einem einjährigen Haushaltsschulkursus teil, der mit einer staatlichen Abschlußprüfung abschloß.

Zum Sommersemester 1960 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen zum Medizinstudium. Nach dem Wintersemester 1960/61 bestand ich dort das Vorphysikum und nach dem Wintersemester 1962/63 das Physikum. Zum Wintersemester 1963/64 wechselte ich an die Universität Hamburg, von wo ich im Sommersemester 1964 nach Marburg kam. Hier beendete ich am 19. September 1966 das medizinische Staatsexamen.

Vom Dezember 1966 bis zum Oktober 1967 war ich als Medizinalassistentin am Hygiene-Institut der Universität Marburg beschäftigt. Seit November 1967 bin ich an der Frauenklinik der Universität Marburg als Medizinalassistentin tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

In Tübingen:

Barbey, Bartels, Bauer, Brecht, v. Brunn, Buddecke,
Dick, Eggstein, Feneis, Fischer, Gieseler, Goessner,
Gohrbrandt, Grell, Groß, Jung, Krüger, Lempp, Matis,
Löricke, Müller, Nultsch, Ohlmeyer, Rathke, Rimbach,
Rüdorff, Spechter, Tonutti, Weitzel.

In Hamburg:

Albrecht, Bartelheimer, Harders, Harmsen, Malorny,
Römer, Schmidt, Schubert, Zuckschwerdt.

In Marburg:

Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz,
Dittrich, Exner, Gedigk, Hamm, Herrmann, Hess, Heuser,
Hildebrandt, Jakob, Knauff, Linneweh, Martini, Marx,
Neubauer, Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer, Schmid,
Schrappe, Schwaiger, Siegert, Straub, Streicher,
Siess, Würterle.

